

## University of Groningen

### Obligaat psychrofile mariene bacteriën

Harder, Willem

**IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.**

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1969

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Harder, W. (1969). *Obligaat psychrofile mariene bacteriën: Isolatie en enkele eigenschappen*. s.n.

#### **Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

#### **Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## SAMENVATTING

Op aarde komen grote gebieden voor waarin de temperatuur permanent laag is. Onder deze gebieden nemen de oceanen, waarvan meer dan 90% van de watermassa een temperatuur bezit lager dan 5 °C, een belangrijke plaats in. Het was een aantrekkelijke opgave te trachten iets te weten te komen over bacteriën die in het mariene milieu voorkomen en speciaal zijn aangepast aan het leven bij lage temperaturen. In de loop van ons onderzoek is de belangstelling voor deze zgn. obligaat psychrofiele bacteriën sterk toegenomen. De kennis van deze organismen is echter nog betrekkelijk gering.

De literatuur over psychrofiele bacteriën, waarvan in hoofdstuk I een overzicht is gegeven, betreft voornamelijk de isolatie en effecten van temperatuur op de groei van facultatief psychrofiele organismen. Uit deze gegevens blijkt dat genoemde organismen tot een groot aantal bekende geslachten behoren en dat zij uit biotopen, waarin de temperatuur varieert en een niet te hoge maximale waarde bereikt, op eenvoudige wijze kunnen worden geïsoleerd. Obligaat psychrofiele bacteriën kunnen uitsluitend worden geïsoleerd uit milieus waarvan de temperatuur permanent laag is. Zij sterven over het algemeen snel bij temperaturen boven 20°C.

Sinds de ontdekking van psychrofiele micro-organismen heeft men zich afgevraagd welke de factoren zijn die deze organismen in staat stellen vrij snel te groeien bij lage temperaturen. Voor alle psychrofiele organismen en meer speciaal voor obligaat psychrofiele geldt verder dat zij een betrekkelijk lage maximumtemperatuur voor de groei bezitten. In het eerste hoofdstuk is een overzicht gegeven van de hypothesen die men heeft opgesteld ter verklaring van beide aspecten van de psychrofiele levenswijze.

Tijdens het eigen onderzoek werden 69 psychrofiele bacteriestammen geïsoleerd uit zeewater- en planktonmonsters, hetgeen is beschreven in hoofdstuk II. Van deze organismen bleken 10 stammen een maximum groeitemperatuur < 20°C te bezitten. Onder deze obligaat psychrofiele bacteriën waren vertegenwoordigers van de geslachten *Pseudomonas*, *Vibrio* en *Spirillum*. Zij werden geïsoleerd met behulp van opho-

pingscultures met lactaat als enige koolstof- en energiebron. Eén van deze organismen werd gekozen voor verder onderzoek. De optimumtemperatuur voor de groei van dit organisme was  $14.5^{\circ}\text{C}$  en de maximumtemperatuur tussen  $19$  en  $20^{\circ}\text{C}$ . Voor de ademhaling werd een optimumtemperatuur van  $23^{\circ}\text{C}$  gevonden en een maximumtemperatuur tussen  $29$  en  $30^{\circ}\text{C}$ . Incubatie van celsuspensies bij  $25^{\circ}\text{C}$  gedurende vijf uur gaf een nauwelijks merkbare afname van de ademhaling. Bij deze temperatuur stierf het organisme langzaam af; na 12 uur was van een suspensie die  $4 \cdot 10^9$  levende cellen bevatte nog  $8 \cdot 10^8$  cellen in leven. Bij  $30^{\circ}\text{C}$  is in een dergelijke suspensie na 6 uur vrijwel geen enkele levende cel meer aanwezig. Gekoppeld aan de afsterving van het organisme trad een toename van de UV-extinctie van de bacterievrije cultuurvloei stof op. In cultures die bij  $22.5^{\circ}\text{C}$  werden geïncubeerd in een volledig voedingsmedium kon geen eiwitsynthese worden aangetoond. Bij deze temperaturen trad nog een zeer geringe RNA- en DNA-synthese op, maar bij  $25^{\circ}\text{C}$  was ook synthese van deze macromoleculen niet meer mogelijk. Uit deze gegevens werd geconcludeerd dat er mogelijk een verband bestaat tussen de storing in de eiwitsynthese bij supermaximale temperaturen en de maximumtemperatuur voor de groei van ons organisme.

Bij temperaturen boven de optimumtemperatuur voor de groei neemt de maximum specifieke groeisnelheid ( $\mu_{\text{max}}$ ) van het organisme snel af met toenemende temperatuur. De factoren die hiervoor verantwoordelijk zijn behoeven niet noodzakelijkerwijs dezelfde te zijn als die welke de maximumtemperatuur voor de groei vastleggen. Daarom werd getracht eveneens een verklaring te vinden voor de afname van  $\mu_{\text{max}}$  bij superoptimale temperaturen. Hiertoe werd het organisme gekweekt in een chemostaat bij constante submaximale groeisnelheid. Zoals in hoofdstuk III is beschreven, werd de groeisnelheid zo laag gekozen dat in het temperatuurtraject van  $5 - 19^{\circ}\text{C}$  een evenwichtstoestand mogelijk was. Terwijl in batch cultuur een verhoging of verlaging van de temperatuur boven resp. beneden de optimumtemperatuur aanleiding gaf tot een verlaging van  $\mu_{\text{max}}$  bleken cellen, die met constante submaximale snelheid groeiden in een chemostaat, in staat de effecten van temperatuurverhoging resp. -verlaging zo te compenseren, dat de groeisnelheid op

dezelfde submaximale snelheid werd gehandhaafd. Bij suboptimale temperaturen bestond de compensatie uit een verhoging van het RNA-gehalte van de cellen en een toename van de concentratie aan ademhalingsenzymen. Op deze wijze kon de vertraging van de snelheid van chemische reacties in de cel bij verlaging van de temperatuur worden opgevangen. Bij verhoging van de temperatuur werd, tot 4°C boven de optimumtemperatuur, eveneens een toename van het RNA-gehalte van de cellen gevonden. Deze onverwachte toename werd geïnterpreteerd als een compensatie voor een met de temperatuur toenemende inefficiëntie van het eiwitsynthetiserend apparaat van de cel. Het was mogelijk deze veronderstelling te steunen d.m.v. experimenten met cellen die bij een verdunningssnelheid van 0.05 uur<sup>-1</sup> en een temperatuur van 10 resp. 18°C waren gekweekt. Hoewel het RNA-gehalte van deze cellen vrijwel identiek was, gedroegen zij zich verschillend t.o.v. een gelijktijdige verandering van verdunningssnelheid en temperatuur tot resp. 0.10 uur<sup>-1</sup> en 14°C. De cultuur die bij 10°C was gekweekt, was in staat onder de nieuwe condities verder te groeien zonder noemenswaardige aanpassing van de celdichtheid en het RNA-gehalte van de cellen. De cultuur die bij 18°C was gekweekt, vertoonde echter een sterke daling van de celdichtheid. Pas nadat het RNA-gehalte van deze cellen sterk was toegenomen, waren ze in staat het hoofd te bieden aan de nieuwe omstandigheden. In experimenten, waarin de snelheid van inductie van melkzuurdehydrogenase werd bestudeerd in cellen die bij 10 en 18°C waren gekweekt, werden eveneens aanwijzingen verkregen voor de veronderstelde inefficiëntie van de eiwitsynthese bij superoptimale temperaturen. Aan de hand van deze experimenten kon een hypothese worden opgesteld met behulp waarvan de vorm van de  $\mu_{\text{max}}$ -temperatuur curve voor ons organisme kan worden verklaard.

De veronderstelling dat in ons organisme bij superoptimale temperaturen een storing in de eiwitsynthese optreedt, is gebaseerd op resultaten verkregen in indirecte experimenten. Alvorens uitspraken te kunnen doen van meer algemeen karakter, zullen directe benaderingsmethoden moeten worden uitgewerkt en worden toegepast op een groter aantal obligaat psychrofiële organismen.

De uit de Noordzee geïsoleerde chemo-organotrofe obli-

gaat en facultatief psychrofiele bacteriën bleken in staat te zijn eenzelfde reeks van organische substraten te kunnen benutten voor de groei. Het feit dat beide typen organismen worden aangetroffen, doet vermoeden dat er in zee milieuomstandigheden kunnen voorkomen, waarbij vertegenwoordigers van elk der beide groepen in het voordeel kunnen zijn. Aangezien het resultaat van microbiële competitie, onder natuurlijke omstandigheden waarin groei mogelijk is, wordt beslist door een verschil in groeisnelheid, leek het waarschijnlijk dat voor beide soorten organismen een verschil zou bestaan in de wijze waarop de substraatconcentratie en/of de temperatuur de groeisnelheid beïnvloedt.

De oecologische betekenis van beide factoren werd nagegaan in experimenten, waarin de groeisnelheid van een vertegenwoordiger van elke groep organismen werd gemeten bij verschillende substraatconcentraties en temperaturen. Deze experimenten zijn beschreven in hoofdstuk IV. De maximum specifieke groeisnelheid bij verschillende temperaturen werd bepaald in batch cultuur, terwijl competitie-experimenten bij groeibeperkende substraatconcentraties en verschillende temperaturen werden uitgevoerd in een chemostaat. Aan de hand van de verkregen resultaten werd voor beide organismen de relatie tussen de specifieke groeisnelheid en de concentratie van het groeibeperkende substraat bij verschillende temperaturen bepaald. Hieruit kon worden afgeleid dat het obligaat psychrofiele organisme bij lage temperaturen, zowel bij hoge als bij lage substraatconcentraties, in staat was sneller te groeien dan het facultatief psychrofiele. Wanneer het gevonden verschil tussen ob. gaat en facultatief psychrofiele organismen een algemeen verschijnsel blijkt te zijn, dan kan worden geconcludeerd dat obligaat psychrofiele bacteriën verantwoordelijk zijn voor mineralisatieprocessen in koude natuurlijke milieus (oceanen, polen). In deze milieus kunnen ze met succes concurreren tegen facultatief psychrofiele, vanwege hun grotere groeisnelheid bij lage temperaturen. De prijs hiervoor is kennelijk dat ze niet in staat zijn te groeien bij temperaturen boven ca. 25°C. Het is vooralsnog niet duidelijk waarom dit een noodzakelijke consequentie is van het vermogen bij lage temperaturen relatief snel te kunnen groeien.

## SUMMARY

Vast areas are found on earth which show a permanently low temperature. Among these the oceans, of which more than 90% (by volume) is colder than 5°C, hold an important place. It was an attractive problem to try to further the knowledge of marine bacteria which are adapted to life at low temperatures. During the course of our investigations the interest in these so called obligately psychrophilic bacteria has been increasing. However, our knowledge of these organisms is still limited.

The literature on psychrophilic bacteria, which has been reviewed in chapter I, consists mainly of reports of the isolation of facultative psychrophiles and of effects of temperature on their growth. From these reports it appears that they can be isolated from a wide variety of habitats in cold and temperate regions. Obligate psychrophiles can be isolated only from habitats which show a permanently low temperature. Generally they die rapidly at temperatures above 20°C.

After the discovery of psychrophilic micro-organisms, research has been directed both towards an explanation of their capability to grow well at low temperatures and of their relatively low maximum temperature for growth. In the first chapter a review is given of hypotheses which have been put forward to explain these aspects of the psychrophilic way of life.

In the present investigation 69 psychrophilic bacteria were isolated from the North Sea and from marine plankton samples. As is described in chapter II, 10 strains showed a maximum growth temperature < 20°C. Among these, obligately psychrophilic representatives were found of the genera *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Spirillum*. These bacteria were isolated from enrichment cultures with artificial seawater containing lactate as C- and energy source. One of these organisms was used for further investigations. Its optimum temperature for growth was 14.5°C and the maximum growth temperature was between 19 and 20°C. Respiration was optimal at 23°C and no inactivation of respiratory

activity was found within 5 hours at 25°C. At this temperature there was a slow decrease of viability. A suspension containing  $4 \cdot 10^9$  viable cells/ml showed a reduction to  $8 \cdot 10^8$  viable cells/ml after incubation for 12 hours at 25°C. At 30°C, the decrease of viability was more rapid. At that temperature a similar suspension was almost completely killed within 6 hours. A concomitant release of UV-absorbing material from the cells was observed. The amount of this material increased with increasing temperatures, but was small at 5°C.

In cultures, which were grown at 14°C, and then incubated in complete growth medium at 22.5°C, protein synthesis could not be detected. At this temperature synthesis of RNA and DNA was small and at 25°C neither protein synthesis nor RNA and DNA synthesis was found. From these observations it was concluded that thermal inactivation of protein synthesis at supermaximal temperatures might be the reason for the low maximum temperature for the growth of our organism.

However, a temperature induced impairment found at supermaximal temperatures need not necessarily be related to temperature effects responsible for the rapid decline in maximum specific growth rate at superoptimal temperatures. In order to trace factors which could give a clue to the latter problem, the organism was grown in a chemostat at a constant submaximal rate. As is described in chapter III, the growth rate chosen was low enough to give a steady state over a temperature range of 5 - 19°C. Whereas a temperature decrease below optimum or a temperature increase above optimum resulted in a decrease of the maximum specific growth rate, cells growing at a constant submaximal rate were found to be able to compensate both the temperature induced decrease of chemical reaction rates when temperature was lowered below the optimum, as well as the temperature induced impairment of biosynthesis at temperatures above optimum.

At suboptimal temperatures the compensation for a temperature decrease was found to consist of an increase of the RNA-content of the cells and of an increase of the concentration of respiratory enzymes. In this way the cell is able to maintain the same submaximal growth rate at lower

temperatures. An increase of cellular RNA-content was also found at superoptimal temperatures when the temperature was increased up to 4 degrees above optimum. This unexpected increase was considered to be a compensation for a decrease of the efficiency of the protein synthesizing machinery of the cell. This hypothesis was supported by experiments with cells grown at a dilution rate of  $0.05 \text{ hour}^{-1}$  and a temperature of 10 and  $18^{\circ}\text{C}$ , respectively. Even though the RNA content of these cells was equal, the response to a simultaneous shift to  $14^{\circ}\text{C}$  and  $D = 0.1 \text{ hour}^{-1}$  was different. The  $10^{\circ}\text{C}$ -grown cells continued growth without a change in cell concentration, but the culture previously grown at  $18^{\circ}\text{C}$  could not cope with the altered conditions until the cellular RNA concentration was increased. Further evidence for an inefficiency of protein synthesis at super-optimal temperatures was obtained by studying the kinetics of induction of lactic dehydrogenase (lactate:cytochrome c oxidoreductase, EC 1.1.2.3) in 10- and  $18^{\circ}\text{C}$ -grown cells. From these experiments a hypothesis could be formulated which explains the shape of the  $\mu_{\text{max}}$ -temperature curve of our organism.

Even though the evidence is indirect, the above experiments can best be explained by assuming a temperature induced impairment of protein synthesis in the obligate psychrophile at temperatures above optimum for growth. Methods for a more direct approach to the solution of this problem will have to be worked out and should be applied to a large number of psychrophiles, before conclusions of more general character can be drawn.

The chemo-organotrophic obligately and facultatively psychrophilic bacteria isolated from North Sea water appeared to utilize a more or less similar range of organic substrates. The mere existence of both groups of organisms suggests that environmental conditions exist for representatives of each of this groups which favour them in competitive processes. Under natural conditions which allow growth, the outcome of such processes is determined by a difference in growth rates. Since both obligate and facultative psychrophiles utilized the same kinds of organic substrates, it seemed likely that differences might exist in the way in which substrate concentration and/or temperature affected



the growth rate of these organisms. In order to trace the ecological significance of both factors, experiments with a representative of both groups of organisms were carried out at various temperatures and concentrations of a C- and energy source. These experiments are described in chapter IV. Maximum specific growth rates at different temperatures were determined in batch culture, whereas competition experiments with growth limiting substrate concentrations were carried out at different temperatures in a chemostat. From the results, the relation between the specific growth rate and the substrate concentration of the growth limiting substrate of both types of organisms at different temperatures could be deduced. It was found that both at low and high substrate concentrations, the obligate psychrophile grew faster than the facultative psychrophile at the lower temperature extreme. When this turns out to be a general phenomenon, it can be concluded that it are the obligately psychrophilic bacteria which are responsible for mineralization processes in cold natural environments as ocean waters and the arctic and antarctic regions. It is in these environments that they can successfully compete with facultative psychrophiles because of their higher growth rates. The price to be paid for this advantage apparently is the inability to grow at temperatures above ca 25°C. It is not yet clear why this should necessarily be so.